

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
**europäischen Patentschrift**

⑧7 EP 0 317 001 B1

⑩ **DE 38 78 167 T 2**

⑤1 Int. Cl. 5:  
**G 01 N 33/553**  
G 01 N 33/58  
G 01 N 33/532

②1 Deutsches Aktenzeichen: 38 78 167.0  
⑧6 Europäisches Aktenzeichen: 88 202 521.6  
⑧6 Europäischer Anmeldetag: 11. 11. 88  
⑧7 Erstveröffentlichung durch das EPA: 24. 5. 89  
⑧7 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 3. 2. 93  
④7 Veröffentlichungstag im Patentblatt: 27. 5. 93

DE 38 78 167 T 2

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
16.11.87 EP 87202231

⑦3 Patentinhaber:  
Janssen Pharmaceutica N.V., Beerse, BE

⑦4 Vertreter:  
Stolberg-Wernigerode, Graf zu, U., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Suchantke, J., Dipl.-Ing.; Huber, A.,  
Dipl.-Ing.; von Kameke, A., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Voelker, I., Dipl.-Biol.; Franck, P., Dipl.-Chem.ETH  
Dr.sc.techn., Pat.-Anwälte, 2000 Hamburg

⑧4 Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU, NL, SE

⑦2 Erfinder:  
Leunissen, Johannes L.M., B-2330 Merksplas, BE; De  
Brabander, Marc J., B-2153 Zoersel, BE; Van de Plas,  
Petrus F.E.M., NL-4817 CM Breda, NL

⑤4 Auf ultrakleine kolloidale Metallteilchen gegründetes, allgemein anwendbares Nachweissystem.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 38 78 167 T 2

Während der letzten Jahre sind Metallteilchen kleiner Größe, insbesondere kolloidale Goldteilchen, in zunehmendem Maße für den Nachweis und/oder die quantitative Bestimmung spezifischer Bindungsmittel und/oder von den diesen entsprechenden, bindungsfähigen Substanzen verwendet worden. Gewöhnlich sind solche bindungsfähigen Substanzen biologischen Ursprungs, und ihre Bestimmung mittels Markierens mit einem Metall hat sich auf verschiedenen Gebieten der Biochemie, Pharmakologie, Zytologie und Histologie als nützlich erwiesen. Die betreffenden Techniken haben weitverbreitete Anwendung gefunden, und sie sind für diagnostische Zwecke besonders attraktiv.

Im Prinzip beruht der Gebrauch kolloidaler Metallteilchen als Marker auf der Tatsache, daß das spezifische Bindungsmittel, oder irgendeine Substanz, die von demselben gebunden werden kann, wenn es bzw. sie unter den richtigen Bedingungen mit den kolloidalen Metallteilchen in Berührung gebracht wird, sich stark daran absorbiert, ohne seine (ihre) Affinität für sein (ihr) Bindungsgegenstück bzw. bindungsfähiges Gegenstück zu verlieren. In den meisten Fällen wird die Beziehung zwischen einem spezifischen Bindungsmittel und der diesem entsprechenden, bindungsfähigen Substanz bzw. den diesem entsprechenden, bindungsfähigen Substanzen von dem Typus Antigen-Antikörper, Antikörper-Antigen, Protein-Protein, Protein-Ligand, Rezeptor-Ligand oder Nukleinsäure-komplementäre Nukleinsäure sein. Daher werden die so markierten, spezifischen Bindungsmittel oder die so markierte, spezifische, bindungsfähige Substanz, wenn sie mit ihren jeweiligen Gegenständen in Wechselwirkung treten gelassen werden bzw. wird, ihren Marker an dem während der Wechselwirkung gebildeten Komplex befestigen, und demzufolge kann der Nachweis dieses Komplexes leicht unter Ausnützung der Eigenschaften der kolloidalen Metallteilchen durchgeführt werden.

In Abhängigkeit von den jeweiligen Umständen können die kolloidalen Metallteilchen z.B. durch direkte visuelle Prüfung, durch mikroskopische Techniken oder durch spektralphotometrische Techniken nachgewiesen werden. Eine Beschreibung der "Immunogold Staining (IGS) Technique" und der "Sol Particle Immuno Assay (SPIA) Technique", von spezifischen Anwendungsgebieten und Verbesserungen hiervon findet sich z.B. in den US-PS'en Nrn. 4 313 734, 4 446 238, 4 420 558, 4 775 636 und 4 752 567,

sowie in der IBRO-Handbuchreihe, Wiley, New York, 1983, Seiten 347 bis 372.

Bisher sind Marker aus kolloidalem Metall mit einer breitgestreuten Vielfalt von Teilchengrößen hergestellt worden. Typische Beispiele sind in "Techniques in Immunochimistry", Bd. 2 (1983), und in dem "Journal of Histochemistry and Cytochemistry", 35, 1191-1198 (1987), sowie in den dort angeführten Literaturstellen beschrieben. Gewöhnlich werden die Marker aus kolloidalem Metall in einem Größenbereich zwischen 5 und 20 nm aufgebracht, doch sind einige Marker mit kleiner Teilchengröße des kolloidalen Metalles von etwa 2,6 nm in Histochemistry (1985), 83:409-411, beschrieben worden. Nachweissysteme auf der Basis von Markern aus kolloidalem Metall einer kleinen Teilchengröße weisen eine Anzahl von Vorteilen gegenüber spezifischen Bindungsmitteln auf, die mit größeren Metallteilchen markiert sind. Im spezielleren ergeben sie eine höhere Markierungsdichte und bieten eine Zunahme in der Auflösung bei der Elektronenmikroskopie. Nachweissysteme auf der Basis dieser kleinen kolloidalen Metallteilchen sind jedoch wegen ihrer Instabilität und fehlenden Reproduzierbarkeit kaum untersucht worden. Ein Ziel der vorliegenden Erfindung liegt daher in der Schaffung reproduzierbarer Nachweissysteme auf der Basis stabiler und biologisch verträglicher, ultrakleiner Metallteilchen.

Durch die vorliegende Erfindung wird ein Aggregat zum qualitativen oder quantitativen Bestimmen bindungsfähiger Substanzen zur Verfügung gestellt, welches ein kolloidales Metallteilchen und ein spezifisches Bindungsmittel für die genannte bindungsfähige Substanz umfaßt, und welches dadurch gekennzeichnet ist, daß der mittlere Durchmesser der kolloidalen Metallteilchen in einen Bereich zwischen 2 und 0,8 nm fällt. Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Aggregat zum Bestimmen bindungsfähiger Substanzen geschaffen, welches ein kolloidales Metallteilchen und ein spezifisches Bindungsmittel für die genannte bindungsfähige Substanz umfaßt, und welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die Größe des Metallteilchens so ausgewählt ist, daß das Aggregat dadurch befähigt wird, in biologische Standardproben einzudringen.

Gemäß noch einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum

Bestimmen einer bindungsfähigen Substanz unter Verwendung des oben identifizierten Aggregates geschaffen.

Das Aggregat der vorliegenden Erfindung eignet sich besonders gut für die Bestimmung immunchemischer Komponenten, wie z.B. von Haptenen, Antigenen und Antikörpern.

Die kolloidalen Teilchen der vorliegenden Erfindung sind entweder kolloidale Gold-, Silber-, Platin-, Palladium-, Thallium-, Kupfer- oder Nickelteilchen. Bevorzugte Beispiele von Teilchen umfassen Gold-, Silber- und Platinteilchen, wobei die Goldteilchen in höchstem Maße bevorzugt sind. Weiterhin können die Teilchen radioaktiv sein, nämlich radioaktive Goldteilchen, radioaktive Silberteilchen und radioaktive Platinteilchen und dgl. mehr sein.

Im allgemeinen basiert die Herstellung von ultrakleinen kolloidalen Metallteilchen der vorliegenden Erfindung auf der homogenen Reduktion einer geeigneten Menge eines entsprechenden Salzes, einer entsprechenden Säure oder eines entsprechenden Komplexes des erforderlichen Metalles mit einem starken Reduktionsmittel bei niedriger Temperatur, um zu bewirken, daß das Salz, die Säure oder der Komplex unter Bildung ultrakleiner, kolloidaler Metallteilchen reduziert wird, welche in einem Dispersionsmedium, wie z.B. Wasser, geradkettigen oder verzweigt-kettigen Alkoholen, die jeweils 1 bis 10 Kohlenstoffatome aufweisen, z.B. Ethanol oder Methanol, mit Wasser vermischbaren Ethern, z.B. Dioxan oder Diethylether, und Gemischen hievon, dispergiert sind. Bevorzugte Metallsalze, -säuren oder -komplexe umfassen Kaliumtetrachlorplatinat, Silbernitrat, Chlorgold(III)-säure und dgl. Salze, Säuren und Komplexe oder deren radioaktive Isotopen. Ein wirksames Reduktionsmittel in dem Verfahren ist Phosphor, insbesondere weißer Phosphor, welcher in stöchiometrischer Menge oder in geringem Überschuß zugesetzt wird. Geeignete Bedingungen für dieses Verfahren umfassen einen pH-Wert zwischen etwa 2 und 11, eine Temperatur zwischen 0 und 10°C, vorzugsweise unter 4°C, und kräftiges Umrühren, welches zwischen 100 und 1000 U/min variiert. Die Reduktionsreaktion kann eine sofortige sein, oder sie kann so lange wie 10 min dauern, und sie wird durch das Auftreten einer spezifischen Farbe, wie z.B. Braun im Falle des kolloidalen Goldes, angezeigt.

Bei einer derzeit bevorzugten Ausführungsform wird die homogene Reduktion bei einer Temperatur zwischen 0 und 4°C durchgeführt, indem man: i) eine wäßrige Lösung eines entsprechenden Salzes, einer entsprechenden Säure oder eines entsprechenden Komplexes des erforderlichen Metalles herstellt; ii) eine wäßrige Phosphorsuspension durch Vermischen von Wasser mit einer entsprechenden Menge einer gesättigten Lösung von Phosphor in einem niederen Alkanol, z.B. Ethanol, oder einem Ether, z.B. Diethylether, herstellt; iii) rasch eine der Lösungen zu der anderen unter kräftigem Rühren zur Bildung eines kolloidalen Sols zugibt; (iv) und, gewünschtenfalls, die überschüssige Menge des Reduktionsmittels und/oder des niederen Alkanols oder Ethers von dem Sol bei einer niedrigen Temperatur, vorzugsweise bei einer Temperatur unter 10°C, und gegebenenfalls unter reduziertem Druck, entfernt.

Insbesondere können die ultrakleinen kolloidalen Goldteilchen durch Vermischen einer Volumenseinheit von 0,005 bis 0,01 %iger Tetrachlorgold(III)-säurelösung und 1 Volumenseinheit einer wäßrigen Suspension von weißem Phosphor während einer beschränkten Zeitspanne und bei einer Temperatur zwischen 0 und 4°C hergestellt werden. Die wäßrige Suspension von weißem Phosphor wird dabei durch Zugabe von 0,005 bis 0,0075 Volumenseinheiten einer klaren und gesättigten Lösung von weißem Phosphor (4°C) in Ethanol zu annähernd 1 Volumenseinheit destilliertem Wasser hergestellt. Anschließend wird die überschüssige Menge des Reduktionsmittels gewünschtenfalls bei einer Temperatur unter 10°C und unter reduziertem Druck sowie nach Zugabe einer Basenmenge, welche ausreicht, um den restlichen Phosphor in Phosphin umzuwandeln, entfernt, wobei die restlichen Spuren des Reduktionsmittels durch Oxidation, durch Hindurchleiten von Luft durch das Sol, oder durch Zugabe eines Oxidationsmittels, wie z.B. Wasserstoffperoxid, entfernt werden können.

Die Messung der Kolloide unter Verwendung eines Typus von Transmissions-Elektronenmikroskop des Modells Philips EM 420 zeigt, daß der mittlere Durchmesser der ultrakleinen kolloidalen Metallteilchen in dem so hergestellten Sol des kolloidalen Metalles in einen Bereich zwischen 0,8 und 2 nm, insbesondere zwischen 1 und 1,8 nm, fällt, und vorzugsweise unter 1,6 nm beträgt, und daß die Größenverteilung einer Glockenkurve entspricht. Der Variationskoeffizient ist dabei kleiner als 20 %, gewöhnlich kleiner als 15 %, und er liegt insbesondere zwischen 12 % und

6 %.

Es ist vorgesehen, daß die so hergestellten, kolloidalen Metallteilchen einen kristallinen Kern haben und aus wenigstens drei Metallatomen bestehen. Es wird weiterhin angenommen, daß die bevorzugten kolloidalen Metallteilchen zwischen 12 und 600 Metallatomen enthalten.

Das Binden der Metallteilchen an spezifische Mittel oder an irgendwelche Mittel, die von denselben gebunden werden können, und die verschiedenen Methoden des direkten oder indirekten Verbindens derselben mit den gewünschten bindungsfähigen Substanzen, ist ähnlich wie bei den betreffenden auf dem Fachgebiet bekannten Verfahren. Diesbezüglich sei auf die US-PS'en Nrn. 4 313 734 und 4 775 636; auf Immunohistochemistry, Cuello, A.C. (Hsg.), IBRO-Handbuchreihe, Wiley, New York, 1983, Seiten 347 bis 372; auf Techniques in Immunocytochemistry, Bd. 2, Seiten 217 bis 284 (1983); und auf Immunochemistry, Wright, Bristol, 1986, Seiten 115 bis 146, verwiesen.

Beispielsweise wird das Binden an das spezifische Bindungsmittel leicht dadurch bewirkt, daß man die ultrakleinen Metallteilchen, vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 0 und 10°C, mit einem wäßrigen Medium eines entsprechenden pH-Wertes in Berührung bringt, in welchem die gewünschten Bindungsmittel, z.B. Antikörper, gelöst sind. Ein entsprechender pH-Wert liegt dabei zwischen 4,5 und 10. Um die Teilchen vor nicht-selektiven Wechselwirkungen mit nicht-spezifischen Proteinen der Testproben zu schützen, mag es angemessen sein, Löschmittel oder Stabilisatoren, wie z.B. immunchemisch inerte polare Makromoleküle, wie z.B. Rinderserumalbumin (BSA), Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyethylenglykol (PEG), zuzugeben. Nach einer geeigneten Zeitspanne können die Aggregate konzentriert und nach auf dem Fachgebiet bekannten Verfahrenswegen, wie z.B. einer Vakuumdialyse, dialysiert werden.

Die so hergestellten Aggregate sind relativ stabil und reproduzierbar, verglichen mit den ungebundenen, ultrakleinen, kolloidalen Teilchen, insbesondere dann, wenn die gewünschten Bindungsmittel, wie z.B. Antikörper und/oder deren Fragmente, unmittelbar nach Herstellung des Sols an die Kolloide gebunden werden. Diese Eigenschaften lassen sich leicht durch Messungen der Teilchengröße mit Elektronenmikroskopie oder

durch das Fehlen von Veränderungen im Absorptionsspektrum in dem sichtbaren Spektrum über einen Bereich zwischen 480 und 540 nm nachweisen.

Es ist überraschenderweise gefunden worden, daß das mittlere Verhältnis zwischen den kolloidalen Metallteilchen und den Bindungsmitteln in den so hergestellten Aggregaten wenigstens 1 beträgt, und insbesondere etwa 2 beträgt, welche Eigenschaft durch die statistische Analyse der Frequenz von Einzelteilchen gegenüber Mehrfachteilchen von Aggregaten in Mikrobildern aus der Elektronenmikroskopie aufgezeigt worden ist.

Ein weiterer Punkt, der im Vergleich zu den Nachweissystemen des Standes der Technik betont werden sollte, liegt in der Fähigkeit der vorliegenden Aggregate, in biologische Standardproben, insbesondere in Kryoschnitte und in chemisch fixierte, intakte Zellen einzudringen. Sonden auf der Basis von 3 nm-Teilchen oder noch größeren Teilchen dringen in biologische Standardproben nicht ein, ausgenommen nach einer ausgedehnten Behandlung der Präparate mit Detergentien, bei welchen Behandlungen die biologische Strukturkohärenz stark zerstört wird.

Ein wichtiger Faktor, welcher das Eindringvermögen eines Aggregates mitbestimmt, ist der physikalische Durchmesser des von dem Metallteilchen und dem Bindungsmittel gebildeten Aggregates. Der hydrodynamische Radius des kolloidalen Metallteilchens ist um etwa 50 % größer als der tatsächliche physikalische Durchmesser des festen Teilchens. Es ist bekannt, daß der hydrodynamische Radius nach Absorption des spezifischen Bindungsmittels kleiner ist, woraus sich ergibt, daß für Aggregate mit Goldteilchen, die kleiner als 5 nm sind, der tatsächliche Radius weitgehend von dem Radius des eigentlichen Bindungsmittels bestimmt wird. Dies bedeutet wiederum, daß das Eindringvermögen eines "3-5 nm-Aggregates" und eines "1 nm-Aggregates" sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden sollten.

Im Gegensatz hierzu ist nunmehr gefunden worden, daß Immunglobulin (IgG), welches an ein oder mehrere ultrakleine kolloidale Teilchen gekuppelt ist, tatsächlich in Kryoschnitte eindringt, während dies bei mit Protein A überzogenen 4 nm-Goldteilchen nicht der Fall ist.



Die Aggregate der vorliegenden Erfindung dringen nicht nur in Kryoschnitte ein, sondern sie dringen auch in chemisch fixierte, intakte Zellen ein, welche gegebenenfalls auf sehr sanfte Weise permeabilisiert worden sind, nämlich z.B. durch eine Behandlung mit 0,05 bis 0,5%igem Triton X-100 während 1 bis 15 min nach dem Fixieren mit einem 0,5-1%igen Glutaraldehyd in PBS-Puffer (10 mM Phosphatpuffer; 150 mM NaCl, pH 7,4) oder mit 0,1%igem Saponin in PHEM-Puffer (1 mM  $MgSO_4$ ; 10 mM EGTA; 60 mM PIPES; 25 mM HEPES; pH 6,9) während 1 bis 15 min, nach dem Fixieren mit 0,5 bis 1%igem Glutaraldehyd.

Unter ähnlichen Bedingungen dringen einige Aggregate der vorliegenden Erfindung sogar in die Kerne von Eukaryontenzellen, wie z.B. PTK-2-Zellen, ein.

Weiterhin sei bemerkt, daß in Gelfiltrationsversuchen, mit z.B. Ultro Gel ACA 44<sup>®</sup> (LKB), die spezifischen Bindungsmittel, welche an eines oder an mehrere der ultrakleinen kolloidalen Metallteilchen gebunden sind, sich ähnlich verhalten wie ungekuppelte spezifische Bindungsmittel, während sich Aggregate auf der Basis größerer kolloidaler Metallteilchen wie Substanzen mit einem hohen Molekulargewicht verhalten.

Als Substanzen, welche gemäß der Erfindung nachgewiesen werden können, kann irgendeine Substanz angeführt werden, für welche es ein spezifisches Bindungsmittel gibt. Solche Substanzen umfassen beispielsweise, ohne Beschränkung darauf, Zelloberflächen- und Gewebeantigene, Rezeptoren, biologische Substanzen, die von lebenden Organismen ausgeschieden worden sind oder aus diesen stammen, insbesondere biologische Substanzen, welche in biologischen Flüssigkeiten, wie z.B. Speichel, Lymphe, Blut und daraus abgeleiteten Fraktionen, wie z.B. Plasma und Serum, Urin, Hirn-Rückenmarksflüssigkeit, Fruchtwasser und dgl. mehr, vorkommen. Substanzen, welche nachgewiesen werden können, umfassen Proteine, Polypeptide, Peptide, wie z.B. Enzyme, Hormone, Strukturproteine, Rezeptoren, Nukleinsäuren, Vitamine, Polysaccharide, Toxine, Alkaloide, Glykoproteine, Haptene, Metaboliten, pharmakologische Mittel, Pestizide, Schadstoffe, Steroide und irgendein anderes Molekül, für welches in biologischen Systemen ein spezifisches Bindungsgegenstück vorhanden ist oder synthetisiert werden kann.

Die spezifischen Bindungsmittel, welche gemäß der Erfindung verwendet

werden können, können von unterschiedlicher Natur sein, doch werden sie in vielen Fällen Antikörper gegen spezifische Antigene oder Haptene sein. Als Antikörper können Immunglobuline, wie z.B. IgM, IgG, IgA, IgD und IgE, wobei IgG bevorzugt ist, und deren Fragmente, wie z.B. Fc, Fab und F(ab)<sup>2</sup>, angeführt werden. Die Antikörper können polyklonale oder monoklonale sein. Als ein Beispiel für andere spezifische Bindungssubstanzen als Antikörper können Staphylococcus-aureus-Protein A, welches sich spezifisch an Immunglobuline aus verschiedenen tierischen Spezies bindet, Protein G, Streptavidin und Avidin angeführt werden; andere bindungsfähige Substanzen können Phagen, welche gegebenenfalls chemisch oder genetisch zum Binden molekularer oder zellulärer Materialien adaptiert worden sind, Lektine, welche spezifisch Glykoproteine binden, DNA- oder RNA-Sonden zur Gen-Identifizierung, oder Fragmente derselben, sowie Arzneimittel oder Drogen sein, welche eine ausreichende Spezifität und Affinität für Rezeptoren aufweisen. Im allgemeinen kann auch irgendeine andere molekulare Wechselwirkung von ausreichender Spezifität und Affinität angewendet werden.

Repräsentative Protein-Analyten umfassen die Klassen von Protaminen, Mukoproteinen, Glykoproteinen, Globulinen, Albuminen, Skleroproteinen, Phosphoproteinen, Histonen, Lipoproteinen, Chromoproteinen und Nukleoproteinen. Beispiele für spezifische Proteine sind Präalbumin,  $\alpha_1$ -Lipoprotein, Human-Serumalbumin,  $\alpha_1$ -Säureglykoprotein,  $\alpha_1$ -Anti-Trypsin,  $\alpha_1$ -Glykoprotein, Transcortin, Thyroxin-Bindungsglobulin, Haptoglobin, Hämoglobin, Myoglobin, Ceruloplasmin,  $\alpha_2$ -Lipoprotein,  $\alpha_2$ -Makroglobulin,  $\beta$ -Lipoprotein, Erythropoietin, Transferin, Hämopectin, Fibrinogen, die Immunglobuline, wie z.B. IgG, IgE, IgM, IgA, IgD und IgE, wobei IgG bevorzugt ist, und deren Fragmente, wie z.B. Fc, Fab und F(ab)<sup>2</sup>, Komplement-Faktoren, Prolactin, Blutgerinnungsfaktoren, wie z.B. Fibrinogen, Thrombin usw., Insulin, Melanotropin, Somatotropin, Thyrotropin, Follikel-stimulierendes Hormon, luteinisierendes Hormon, Gonadotropin, Thyreoidea stimulierendes Hormon, Plazenta-Laktogen (HPL), Intrinsic Factor, Transcobalamin, Serumenzyme, wie z.B. alkalische Phosphatase, Laktat-Dehydrogenase, Amylase, Lipase, Phosphatasen, Cholinesterase, Glutamat-Oxaloacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase und Uropepsin, Endorphine, Enkephaline, Protamin, Gewebe-Antigene, bakterielle Antigene, und virale Antigene, wie z.B. Hepatitis-assoziierte Antigene (z.B. HBsAg, HBcAg und HBeAg).

Repräsentative Hapten-Analyten umfassen die allgemeinen Klassen von Arzneimitteln oder Drogen, Metaboliten, Hormonen, Pestiziden, Schadstoffen, Vitaminen und dgl. organischen Verbindungen. Hapten-Hormone umfassen Thyroxin und Triiodthyronin. Die Vitamine umfassen die Vitamine A, B, z.B. B<sub>12</sub>, C, D, E und K, Folsäure und Thiamin. Die Arzneimittel umfassen Antibiotika, wie z.B. Aminoglykoside, z.B. Gentamicin, Tobramycin, Amidacin, Sisomicin, Kanamycin und Netilmicin, Penicillin, Tetracyclin, Terramycin, Chloromycetin und Actinomycetin; Nukleoside und Nukleotide, wie z.B. Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Flavimononukleotid (FMN), Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und dessen Phosphatderivat (NADP), Thymidin, Guanosin und Adenosin; Prostaglandine; Steroide, wie z.B. die Östrogene, z.B. Östriol und Östradiol, Steroide; und andere, wie z.B. Phenobarbital, Phenytoin, Pirimidon, Ethosuximid, Carbamazepin, Valproat, Theophyllin, Koffein, Propranolol, Procainamid, Chinidin, Amitryptilin, Cortisol, Desipramin, Disopyramid, Doxepin, Doxorubicin, Nortryptilin, Methotrexat, Imipramin, Lidocain, N-Acetyl-procainamid, Amphetamine, Katecholamine und Antihistaminika. Weiterhin Herzglykoside und Derivate von Benzodiazepin, Benzimidazol, Piperidin, Piperazin, Imidazol, Triazol, Pyridazin, 1,2,4-Triazindion oder 2,3,5,6-Tetrahydro-imidazo[2,1-b]thiazole, oder Amide, Hydratropssäurederivate oder Trialkylamine.

Benzimidazol-Haptene umfassen Thiabendazol, Fuberidazol, Ciclobendazol, Oxibendazol, Parbendazol, Cambendazol, Mebendazol, Fenbendazol, Flubendazol, Albendazol, Oxfendazol, Nocodazol und Astemizol.

Piperidin-Haptene umfassen Diphenoxylat, Phenoperidin, Haloperidol, Haloperidoldecanoat, Bromperidoldecanoat, Bromperidol, Moperon, Trifluoperidol, Pipamperon, Piritramid, Fentanyl, Benperidol, Droperidol, Benzitramid, Benzetimid, Domperidon, Sufentanil, Carfentanil, Alfentanil, Dexetimid, Milenperon, Difenoxin, Fluspirilen, Penfluridol, Pimozid, Lorcainid, Loperamid, Astemizol, Ketanserin, Levocabastin, Cisaprid, Altanserin, Ritanserin, 3-[2-[4-(4-Fluorbenzoyl)-1-piperidinyl]ethyl]-2,7-dimethyl-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-on, 3-[2-[4-[Bis(4-fluorphenyl)methylen]-1-piperidinyl]ethyl]-2-methyl-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-on und 3-[2-[4-[[3-(2-Furanylmethyl)-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl]amino]-1-piperidinyl]ethyl]-2-methyl-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-on.

Piperazin-Haptene umfassen Azaperon, Fluanison, Lidoflazin, Flunarizin, Mianserin, Oxatomid, Mioflazin, Clocinizin und Cinnarizin.

Beispiele für Imidazol-Haptene sind Metronidazol, Ornidazol, Iprnidazol, Tinidazol, Isoconazol, Nimorazol, Miconazol, Burimamid, Metiamid, Metomidat, Enilconazol oder Imazalil, Etomidat, Econazol, Clotrimazol, Carnidazol, Cimetidin, Doconazol, Sulconazol, Parconazol, Orconazol, Butoconazol, Triadinol, Tioconazol, Valconazol, Fluotrimazol, Ketoconazol, Oxiconazol, Lombazol, Bifonazol, Oxmetidin, Fenticonazol, Tubulazol und (Z)-1-[2-Chlor-2-(2,4-dichlorphenyl)-ethenyl]-1H-imidazol. Triazol-Haptene umfassen Virazol, Azaconazol, Etaconazol, Propiconazol, Penconazol, Itraconazol und Terconazol. Pyridazin-Haptene umfassen z.B. 3-Chlor-6-[3,6-dihydro-4-(3-methylphenyl)-1(2H)-pyridinyl]-pyridazin, 3-Methoxy-6-[4-(3-methylphenyl)-1-piperazinyl]pyridazin und die Verbindungen der EP-A-156 433. 1,2,4-Triazindione umfassen z.B. 2-Chlor- $\alpha$ -(4-chlorphenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl)benzolacetonitril, 2,6-Dichlor- $\alpha$ -(4-chlorphenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl)-benzolacetonitril und die Verbindungen der EP-A-170 316.

Trialkylamine sind z.B. Diisopromin, Prozapin. 2,3,5,6-Tetrahydro-imidazo[2,1-b]thiazole umfassen z.B. Tetramisol oder Levamisol.

Amide umfassen z.B. Closantel, Ambucetamid, Isopropamid, Uzepidmetiodid, Dextranoramid. Ein Hydratropsäure-Hapten ist z.B. Suprofen.

Die Bindungsreaktion wird in fast allen Fällen unter milden Bedingungen ablaufen gelassen werden. Das Reaktionsgemisch wird im allgemeinen ein wäßriges Medium sein, wobei irgendwelche erwünschten, organischen Co-Lösungsmittel in kleinen Mengen vorliegen. Die Temperatur der Reaktion wird unter normalen Umständen während der gesamten Inkubationsperiode auf konstanter Höhe gehalten. Die Temperaturen werden im allgemeinen zwischen 0 und 50°C, noch üblicher zwischen 20 und 40°C liegen. Vorzugsweise läuft die Reaktion bei Zimmertemperatur ab. Der pH-Wert des Reaktionsgemisches variiert zwischen 5 und 10, noch üblicher zwischen 6 und 9. Die Konzentration der verschiedenen Reagentien hängt von der in dem Testmedium erwarteten Analytenmenge ab, wobei eine solche Menge gewöhnlich zwischen  $10^{-3}$  und  $10^{-12}$  M liegt. Wie im Falle der zuvor

beschriebenen Reaktionsparameter basiert die Auswahl in erster Linie auf einer empirisch abgeleiteten Optimierung, welche gegen die Bevorzugungen und Erfordernisse des Technikers abgeglichen wird, der die Tests letzten Endes auf Routinebasis durchführen wird. Keiner der Parameter ist daher von kritischer Natur für die vorliegende Erfindung; vielmehr liegen alle Parameter innerhalb der üblicherweise auf dem Fachgebiet angewendeten Bereiche.

Die Aggregate der vorliegenden Erfindung können unter praktisch allen Umständen verwendet werden, für welche gegenwärtig immunologische Techniken vorgesehen sind, insbesondere solche Techniken, bei denen generell kolloidale Metallteilchen, welche an wohldefinierte organische Substanzen gekuppelt sind, angewendet werden. Aufgrund des Eindringungsvermögens der vorliegenden Aggregate ist deren Gebrauch jedoch nicht auf jene Fälle beschränkt, in denen es gegenwärtig bekannt ist, daß ein Markieren mit Metallen nützlich ist. Im Prinzip kann die vorliegende Erfindung auf die qualitative und/oder quantitative Bestimmung irgendeiner Substanz angewendet werden, für welche spezifische Bindungsmittel vorhanden sind.

Die Aggregate der vorliegenden Erfindung sind auf jenen Gebieten besonders nützlich, auf welchen spezifische Nachweistechiken angewendet werden. Beispielsweise für Anwendungen mit Einsatz von Licht- oder Elektronenmikroskopie, oder von Blotting-Techniken, und zwar gegebenenfalls in Kombination mit Techniken einer chemischen Verstärkung, wie z.B. einer Verstärkung durch Silber, mit elektronischen Verstärkungstechniken, Nachweistechiken auf Basis des Elektronen-Energieverlustes, und/oder der Röntgenstrahlernukleoanalyse.

Geeignete Techniken der Verstärkung durch Silber sind z.B. in der EP-A-165 634, in der EP-A-239 947 und in Histochemistry, 85, 209-214 (1986), beschrieben. Geeignete Techniken der elektronischen Verstärkung sind z.B. in der US-PS Nr. 4 752 567 beschrieben.

Bei Anwendungen unter Einsatz von Lichtmikroskopie sind die vorliegenden Aggregate besonders nützlich für den immunologischen Nachweis von Antigenen in Kombination mit einer chemischen Verstärkung, insbesondere einer Verstärkung durch Silber, und zwar sowohl in Zell- und Gewebe-

schnitten als auch in als Ganzes auf dem Träger montierten Proben (mit intakten Zellen). Die so erzielten Empfindlichkeitswerte sind aufgrund der Tatsache sehr hoch, daß eine große Anzahl von Antigenen für das eindringende Aggregat erreichbar ist, und daß wegen der verringerten sterischen Behinderung eine höhere Markierungsdichte erhalten wird. Beispielsweise sind die Ergebnisse für das Markieren von Tubulin vergleichbar mit jenen oder besser als jene, welche auf der Basis des gleichen spezifischen Antikörpers erhalten worden sind, der aber mit einem Immunfluoreszenz-Marker markiert war. Darüberhinaus ist das erzeugte Signal permanent, es ist keinem raschen Abbau unterworfen, und es ist keine spezielle, mikroskopische Ausrüstung erforderlich. Die nach der Verstärkung durch Silber entstandene Markierung ist teilchenförmig und kann quantifiziert werden.

In elektronenmikroskopischen Anwendungen sind die vorliegenden Aggregate besonders gut geeignet für Hochauflösungs-Untersuchungen von getrennten Makromolekülen oder Fragmenten hiervon. Die Tatsache, daß die Aggregate gemäß der vorliegenden Erfindung befähigt sind, ohne irgendeine besondere Vorbehandlung in biologische Standardproben einzudringen, macht sie besonders nützlich für elektronenmikroskopische Anwendungen, z.B. solche auf die Untersuchung der Substruktur von lebendem Material, wie z.B. Zellen. In Kombination mit der chemischen Verstärkung sind diese Aggregate für Immunlokalisierungsversuche geeignet, wie z.B. für das Immunmarkieren von Zellen oder Gewebeschnitten vor dem Einbetten derselben; das nach dem Schneiden erfolgende Markieren von in Kunststoff eingebettetem Material oder von Kryoschnitten; und das Markieren von ganzen, auf einem Träger montierten Zellen. Das Markieren vor dem Einbetten und nach einer milden Permeabilisierung ergibt ein wirksames Markieren mit hoher Empfindlichkeit (Eindringen und Wirksamkeit), kombiniert mit einer optimierten Konservierung der Ultrastrukturen. Die so nach einer Verstärkung durch Silber entstandene Markierung ist teilchenförmig und kann quantifiziert werden.

Bei Blotting-Anwendungen sind die vorliegenden Aggregate speziell für die Identifizierung von Proteinen in elektrophoretisch aufgetrennten Proteinstreifen geeignet. Im Vergleich zu bereits existierenden Aggregaten ist der Nachweis empfindlicher, und das entstandene Anfärbemuster ist deutlicher aufgezeichnet.

Aufgrund ihres allgemeinen Charakters können die erfindungsgemäßen Aggregate, gewünschtenfalls in Kombination mit einer Verstärkungstechnik, weitere Anwendung in einer Vielfalt von diagnostischen Tests finden, wie z.B. in den folgenden: bei dem Nachweis und der Kennzeichnung von Subpopulationen von T-Lymphozyten; in Schwangerschaftstests auf der Basis des Vorliegens gewisser Hormone (Choriongonadotropin, HCG) im Urin; bei diagnostischen Tests auf verschiedene Infektionskrankheiten, u.a. solche, die durch Pilze (Myzeten) verursacht worden sind, oder solche bakteriellen und insbesondere viralen Ursprungs, wie z.B. Hepatitis B, Autoimmunkrankheiten, z.B. Lupus erythematoses, und Immundefektkrankheiten (z.B. AIDS), Gonorrhoe, Rubella (Röteln), Polyomyelitis und dgl. mehr; in der Diagnostik von Stoffwechselkrankheiten, Endokrinopathien und verschiedenen endogenen Krankheiten, einschließlich der Diagnostik für den Nachweis angeborener Fehlfunktionen von Embryonen auf der Basis des Vorliegens spezifischer Proteine im Fruchtwasser.

Die Erfindung umfaßt weiterhin Systeme von Reagentien, welche alle wesentlichen chemischen Elemente umfassen, die zur Durchführung eines gewünschten Testverfahrens im Rahmen der vorliegenden Erfindung erforderlich sind. Das System von Reagentien kann als Zusammensetzung oder Gemisch in einer kommerziell verpackten Form dargeboten werden, wo die Verträglichkeit der Reagentien dies zuläßt, oder es kann in der Konfiguration einer Testvorrichtung, oder als ein Testkit, nämlich als verpackte Kombination von einem oder mehreren Behältern, welche die entsprechenden Reagentien enthalten, dargeboten werden. Das System von Reagentien kann die Reagentien enthalten, welche für das gewünschte System einer Bindungsreaktion die richtigen sind. Solche Reagentien für die Bindungsreaktion können, zusätzlich zu dem markierten Reagens, ein Bindungsgegenstück zu dem Analyten usw. enthalten. Selbstverständlich kann das System von Reagentien auch irgendwelche anderen Reagentien umfassen, welche auf dem Fachgebiet bekannt sind, und welche von einem kommerziellen Standpunkt und vom Standpunkt des Benützers aus erwünscht sein können, wie z.B. Puffer, Verdünnungsmittel, Standards usw.

### Beispiel 1

Herstellung einer Dispersion von kolloidalem Gold mit einem Gehalt an ultrakleinen Goldteilchen

In einem 1-Liter-Becher wurden 200 ml destilliertes Wasser rasch bei 300 U/min und bei einer Temperatur von 4°C gerührt. 1,2 ml einer Ethanollösung, die bei 4°C mit weißem Phosphor gesättigt worden war, wurden während 15 s unter der Wasseroberfläche zugegeben, und unmittelbar danach wurden 200 ml einer 0,005 bis 0,01%igen wäßrigen Tetrachlorgold(III)-säure zugegeben. Die Beendigung der Reduktion wurde durch das Erscheinen einer braunen Farbe angezeigt. Der Überschuß des Reduktionsmittels wurde anschließend durch kräftiges Rühren des Sols unter reduziertem Druck mit einer Wasserstrahlpumpe während 5 min entfernt, wonach das Sol bei 4°C mit Natriumhydroxid auf einen pH-Wert von 11,5 eingestellt wurde.

### Beispiel 2

Herstellung von mit kolloidalem Gold markierten Anti-Kaninchen-Immunglobulin-(Ig)-Antikörpern

Durch Affinitätschromatographie gereinigte Ziegen-Anti-Kaninchen-Ig-Antikörper wurden während 24 h bei 4°C gegen 5 mM  $\text{NaHCO}_3$  vom pH 9,8 dialysiert. Die Acidität des Goldsols wurde mit einer 0,2M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung auf einen pH-Wert von 9,0 gebracht. 100 ml dieses Goldsols wurden in einem Becher bei Zimmertemperatur gerührt. 5 mg der dialysierten Antikörper wurden zur Erzielung einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. 1 min später wurde 1 g Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt, welches in 10 ml von 1 mM Natriumhydroxid zuvor aufgelöst worden war. Das so erhaltene Aggregat wurde durch Vakuumdialyse gegen TBS-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Natriumchlorid, 20 mM  $\text{NaN}_3$ ; pH 8,2) dialysiert.

### Beispiel 3

Eindringversuch (intakte Zellen)

PTK-2-Zellen wurden auf Deckgläschen gezüchtet. Isolierte Deckgläschen wurden mit PBS-Puffer (10 mM Phosphatpuffer; 150 mM Natriumchlorid; pH 7,4) gewaschen, und nach irgendeiner der folgenden Verfahrensweisen fixiert und/oder permeabilisiert:

Verfahren A:

Die Zellen wurden mit 0,5%igem Glutaraldehyd in PBS-Puffer und 0,2%igem



Triton X-100 während 10 min permeabilisiert. Die Zellen wurden während 15 min mit 0,5%igem Triton X-100 in PBS-Puffer weiter permeabilisiert.

#### Verfahren B:

Die Zellen wurden während 10 min mit 0,5%igem Glutaraldehyd in PBS fixiert und während 15 min mit 0,5%igem Triton X-100 in PBS-Puffer permeabilisiert.

#### Verfahren C:

Die Zellen wurden mit PHEM-Puffer (1 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM EGTA; 60 mM PIPES; 25 mM HEPES; pH 6,9) gewaschen und dann während 10 min mit einer 0,5%igen Glutaraldehydlösung in PHEM-Puffer fixiert. Nach einem Waschen mit einem PHEM-Puffer wurden die Zellen während 15 min mit einer 0,1%igen Saponinlösung in PHEM-Puffer permeabilisiert und dann nochmals mit PHEM-Puffer gewaschen.

#### Verfahren D:

Die Zellen wurden mit 0,5%igem Glutaraldehyd in PBS-Puffer fixiert.

Nach dem Fixieren und Permeabilisieren wurden die Proben während 15 min mit 0,1M  $\text{NaBH}_4$  in Puffer (PBS oder PHEM) behandelt. Das Ganze wurde nacheinander mit PBS- oder PHEM-Puffer (3x5 min) und mit einem TBG-Puffer (20 mM Tris; 150 mM Natriumchlorid; 20 mM  $\text{NaN}_3$ ; 0,1 % (Gew./Vol.) BSA; 0,1 % (Gew./Vol.) CWF-Gelatine (Sigma G 7765) und Saponin, 0,1 %, wenn das Verfahren C angewendet wird; pH 8,2) gewaschen. Das Gemisch wurde während 20 min mit 5%igem normalem Ziegen Serum in TBG-Puffer (+ Saponin) vorinkubiert, und es wurde über Nacht mit Kaninchen-Anti-Tubulin, 1 mg/ml in TBG (+ Saponin), welches mit 1 % von normalem Ziegen-Serum ergänzt war, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen, während jeweils 15 min, mit TBG-Puffer (+ Saponin) wurden die Zellen während 4 h mit Aggregaten aus sekundären Ziegen-Anti-Kaninchen-(IgG)-Antikörpern/kolloidalem Gold (wobei die Antikörperkonzentration  $\pm 1$  mg/ml in TBG-Puffer, 1 % (Gew./Vol.) von normalem Ziegen-Serum beträgt) inkubiert. Das Ganze wurde dreimal während 10 min mit TBG-Puffer (+ Saponin) und dann dreimal, während 10 min, mit PBS-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 2%igem (Gew./Vol.) Glutaraldehyd in PBS-Puffer während 10 min nachfixiert. Das Ganze wurde nacheinander mit PBS-Puffer (3x10 min) und dann mit destilliertem

Wasser (3x1 min) gewaschen. Der Kontrast des Reaktionskomplexes wurde durch Verstärkung mit Silber mit "Intense II<sup>®</sup>" (Janssen Life Science Products) während 15 min erhöht. Die Deckgläschen wurden dehydratisiert und in Pertex<sup>®</sup> (Histo-Lab) eingebettet.

#### Ergebnisse:

Die Aggregate aus Ziegen-Anti-Kaninchen-(IgG)-Antikörpern und ultrakleinem, kolloidalem Gold ( $\pm$  1 nm) drangen in die nach den Verfahrensweisen A, B, C und D präparierten Zellproben ein, während Aggregate aus Ziegen-Anti-Kaninchen-(IgG)-Antikörpern und kolloidalem Gold ( $\pm$  5 nm) nur in die nach der Verfahrensweise A präparierten Proben eindringen.

#### Beispiel 4

Eindringen von ultrakleinen Goldsonden in Semithin-Kryoschnitte

Die Markierungsstärke wird mit der Dicke des Schnittes verglichen.

#### Chemikalien und Reagentien

Polyklonale Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper wurden wie oben beschrieben an ultrakleine Goldteilchen konjugiert. Normales Ziegenserum, GAR-G5nm und Inten SEII, wurden von der Firma Janssen Biotech, Olen/Belgien, bezogen.

PIPES, HEPES, Rinderserumalbumin und Kaltwasserfischgelatine wurden von der Firma Sigma, St. Louis, MO, bezogen.

Glutaraldehyd wurde von BDH, Poole/Vereinigtes Königreich, bezogen.

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt/BRD, bezogen, und sie wiesen Analysenreinheit auf. Alle Kulturflüssigkeiten wurden von der Firma Gibco Paisley/Vereinigtes Königreich, bezogen.

#### Zellkulturen

Eierstockzellen aus dem Chinesischen Hamster (CHO-Zellen) wurden in "Eagle's Minimal Essential Medium" kultiviert, welches mit 10% Rinderfetalserum ergänzt war.

### Präparation der Proben

Nachdem sie aus der Nocodazol-Behandlung freigesetzt worden waren (siehe DeBrabander et al., "Microtubules and Microtubule Inhibitors", 1980, S. 225-268; "Cell Motility", 1981, S. 469-483), wurden mitotische CHO-Zellen in der Metaphase und Telophase während 10 min in 0,5%igem Glutaraldehyd in 60 mM PIPES, 25 mM HEPES; 10 mM EGTA, 1 mM Magnesiumsulfat (PHEM-Puffer), pH 6,9, fixiert.

Die Zellen wurden bei 37°C in 10%iger, verflüssigter Gelatinierungsmasse eingebettet. Als nächstes wurden die Zellen durch Zentrifugieren bei 325xg / oder 3 min (Eppendorf Zentrifuge) pelletiert.

Nach dem Festwerden bei 4°C wurde die Gelbildungsmasse mit 0,5%igem Glutaraldehyd in PHEM-Puffer während 10 min fixiert. Zum Zwecke des Schutzes vor tiefen Temperaturen wurden die Zellpellets mit 0,6-1,5-2,3 M Saccharose in PBS infundiert.

Nach dieser Schutzmaßnahme vor tiefen Temperaturen wurden Zellblocks mit einem Volumen von 1 bis 3 mm<sup>3</sup> ausgeschnitten.

### Kryo-Schneiden

Reihen von Semithin-Kryo-Schnitten (einer Dicke von 0,2 und 0,4 µm) wurden auf einem Reichert FC<sub>4</sub>D-Kryoultramikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden auf Deckgläschen befestigt und über Nacht in PBS von 4°C gelagert.

### Immunologisches Markieren

Die Schnitte wurden während 15 min mit Natriumborhydrid (1 mg/ml) in PBS behandelt, um die restlichen Aldehydgruppen zu reduzieren. Als nächstes wurden die Schnitte während 3 mal 5 min in PBS und während 2 mal 5 min in PBS, das mit 0,8 % BSA, 0,1 % Kaltwasserfischgelatine, 2 mM Azid, pH 7,4 (PBG-Puffer) ergänzt war, gespült. Unspezifisches Anfärben wurde durch Inkubieren der Schnitte in 5%igem normalem Ziegen Serum in PBG-Puffer während 20 min blockiert.

Als nächstes wurden die Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Tubulin (der auf eine Konzentration von 1 µg/ml in PBG-Puffer, der mit 1 % normalem Ziegen Serum ergänzt war, verdünnt war)

während 60 min inkubiert. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper, der entweder an 5 nm-Goldteilchen konjugiert war, oder der an die ultrakleinen Goldteilchen konjugiert war. Der Überschuss der Goldsonde wurde während 3 mal 15 min mit PBG-Puffer gewaschen.

Nach dem Spülen der Schnitte in PBS wurden dieselben während 20 min in 2%igem Glutaraldehyd in PBS fixiert. Für die Sichtbarmachung des Goldsignals im Lichtmikroskop wurde eine Verstärkung durch Silber angewendet. Die Spezifitäts- und Verfahrenskontrollen für das immunzytochemische Anfärben waren wie folgt: Weglassen des Anti-Tubulin-Antikörpers und/oder des an das Gold konjugierten Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpers. Die Schnitte wurden in destilliertem Wasser gespült und in einer Reihe abgestufter Ethanollösungen dehydratisiert.

Nach dem Montieren konnten die Präparate bewertet werden.

#### Ergebnisse

Sowohl die mit dem 5 nm-Gold-Konjugat inkubierten Schnitte als auch die mit dem Konjugat mit den ultrakleinen Goldteilchen inkubierten Schnitte zeigten ein Anfärben der Mikrotubuli und der Masse des nicht-polymerisierten Tubulins im Zytoplasma der CHO-Zellen.

Das Hintergrundanfärben war in beiden Fällen vernachlässigbar. Wurde jedoch die Sonde mit den ultrakleinen Goldteilchen verwendet, dann war das spezifische Signal in einem 0,4- $\mu$ m-Schnitt viel stärker als in einem Reihenschnitt von 0,2  $\mu$ m. Diese Beobachtung stand im Gegensatz zu jener, bei welcher das Konjugat mit den 5 nm-Goldteilchen verwendet worden war. Dort war nämlich die Signalintensität die gleiche geblieben.

#### Beispiel 5

Eindringen von ultrakleinen Goldsonden in Semithin-Kryoschnitte.

Schneiden von immunologisch mit Gold markierten Semithin-Kryoschnitten in der Querrichtung

Semithin-Kryoschnitte (einer Dicke von 0,4  $\mu$ m) von in Gelatine eingebetteten CHO-Zellen wurden am Boden von Kunststoff-Petri-Schalen befestigt. Sie wurden wie im Beispiel 4 beschrieben mit einer 5 nm-Gold-Sonde oder mit der Sonde mit ultrakleinen Goldteilchen markiert. Die mit

den 5 nm-Goldteilchen markierten Kryoschnitte wurden für die elektronenmikroskopische Bewertung ohne Verstärkung durch Silber weiter verarbeitet. Die Zeitspannen für die Verstärkung durch Silber bei den mit der Sonde aus den ultrakleinen Goldteilchen markierten Schnitten dauerten bis zu 4 min.

#### Einbetten in Kunststoff und Zerschneiden

Nachdem die Semithin-Kryoschnitte immunologisch angefärbt worden waren, wurden sie in Reihen abgestufter Ethanollösungen dehydratisiert und in Epon in den Petro-Schalen eingebettet. Nach dem Polymerisieren bei 50°C während 24 h wurden die Petri-Schalen entfernt, und die Schnitte wurden erneut für das Schneiden in der Querrichtung in flachen Formen in Epon eingebettet.

Auf einem Apparat des Typus "Reichert Ultracut E" wurden ultradünne Plastik-Schnitte geschnitten und mit einem mit Kohlenstoff überzogenen Parlodion-Film auf Gittern aufgenommen. Vor der Untersuchung in einem Elektronenmikroskop vom Typus "Philips EM 410" wurden sie mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt.

#### Ergebnisse

Wenn sie richtig behandelt worden waren, zeigten die erneut eingebetteten Semithin-Kryoschnitte eine gut erhaltene Morphologie, obgleich Risse und Sprünge zu sehen waren.

Die Kunststoff-Querschnitte durch die markierten und erneut eingebetteten Semithin-Kryoschnitte ermöglichten die Bestimmung der Gold- oder Gold-Silber-Teilchen auf den Schnitten oder innerhalb der Schnitte. Nach dem Verstärken durch Silber konnten die ultrakleinen Goldteilchen deutlich sichtbar gemacht werden. Eine Zeitspanne des Verstärkens durch Silber von 2 min ergab Gold-Silber-Teilchen einer annähernden Größe von 5 nm. Das Schneiden in der Querrichtung zeigte, daß das immunologische Markieren mit den 5 nm-Gold-Sonden auf die Oberfläche der Semithin-Kryoschnitte beschränkt war, wenn keine sichtbare Beschädigung vorlag. Waren in dem Schnitt jedoch Risse oder Sprünge vorhanden, dann waren die 5 nm-Teilchen innerhalb des Schnittes nur an diesen Stellen sichtbar. Semithin-Kryoschnitte mit einer stark aufgebrochenen Ultrastruktur zeigten ein Eindringen der 5 nm-Gold-Sonde überallhin.

Gut konservierte Kryoschnitte zeigten ein Markieren mit der Sonde aus ultrakleinen Goldteilchen nicht nur auf der Oberfläche des Schnittes, sondern auch durchgehend in deren gesamtem Inneren. Selbst Zellen mit einer intakten Außenzellmembran zeigten eine intensive Markierung. Beschädigte Semithin-Kryoschnitte waren ebenfalls durchgehend markiert.

Patentansprüche:

1. Aggregat zum Bestimmen bindungsfähiger Substanzen, welches ein kolloidales Metallteilchen und ein spezifisches Bindungsmittel für die genannte bindungsfähige Substanz umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß der mittlere Durchmesser des kolloidalen Teilchens in einen Bereich von 0,8 bis 2 nm fällt.

2. Aggregat zum Bestimmen bindungsfähiger Substanzen, welches ein kolloidales Metallteilchen und ein spezifisches Bindungsmittel für die genannte bindungsfähige Substanz umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe des Metallteilchens so ausgewählt ist, daß das Aggregat dadurch befähigt wird, in biologische Standardproben einzudringen, die entweder keiner besonderen Vorbehandlung unterworfen worden sind oder welche durch eine nicht-umfassende Behandlung mit Detergentien derart permeabilisiert worden sind, daß dadurch der biologische strukturelle Zusammenhalt nicht stark zerstört worden ist.

3. Aggregat nach Anspruch 2, wobei die biologischen Standardproben entweder durch eine Behandlung mit 0,05- bis 0,5%igem Triton<sup>®</sup> X-100 während 1 bis 15 min nach einem Fixieren mit 0,5- bis 1%igem Glutaraldehyd in PBS-Puffer (10 mM Phosphatpuffer; 150 mM NaCl, pH 7,4) oder durch eine Behandlung mit 0,1%igem Saponin in PHEM-Puffer (1 mM MgSO<sub>4</sub>; 10 mM EGTA; 60 mM PIPES; 25 mM HEPES; pH 6,9) während 1 bis 15 min nach einem Fixieren mit 0,5- bis 1%igem Glutaraldehyd permeabilisiert worden sind.

4. Aggregat nach Anspruch 2 oder 3, wobei die biologischen Standardproben keiner speziellen Vorbehandlung unterworfen worden sind.

5. Aggregat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die kolloidalen Metallteilchen kolloidale Gold-, Silber-, Platin-, Palladium-, Thallium-, Kupfer- oder Nickelteilchen und deren radioaktive Isotope sind.

6. Aggregat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das mittlere Verhältnis zwischen dem kolloidalen Metallteilchen und dem Bindungsmittel wenigstens 1 beträgt.

7. Aggregat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das spezifische Bindungsmittel ein Antikörper, Avidin, Streptavidin, Protein A oder Protein G ist.

8. Aggregat nach Anspruch 7, wobei das spezifische Bindungsmittel ein Immunglobulin oder ein Fragment desselben ist.

9. Verfahren zum qualitativen oder quantitativen Bestimmen bindungsfähiger Substanzen, gekennzeichnet durch die Verwendung eines in einem der Ansprüche 1 bis 8 beanspruchten Aggregates.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die bindungsfähigen Substanzen ein Teil der Substrukturen in lebendem Material sind.

11. Verfahren zur Herstellung der in einem der Ansprüche 1 bis 8 beanspruchten Aggregate, dadurch gekennzeichnet, daß die kolloidalen Metallteilchen an spezifische Bindungsmittel gebunden werden.

12. Aggregat zum Bestimmen bindungsfähiger Substanzen, nach einem der Ansprüche 1 bis 8, welches Aggregat ein kolloidales Metallteilchen und ein spezifisches Bindungsmittel für die genannte bindungsfähige Substanz umfaßt, und wobei das kolloidale Metallteilchen durch eine homogene Reduktion eines entsprechenden Salzes, einer entsprechenden Säure oder eines entsprechenden Komplexes des erforderlichen Metalles mit einem starken Reduktionsmittel bei einer in einen Bereich von 0 bis 10°C fallenden Temperatur erhältlich ist.

13. Aggregat nach Anspruch 12, wobei die homogene Reduktion die folgenden Stufen umfaßt:



- i) Herstellen einer wäßrigen Lösung eines entsprechenden Salzes, einer entsprechenden Säure oder eines entsprechenden Komplexes des erforderlichen Metalles;
- 5 ii) Herstellen einer wäßrigen Phosphorsuspension durch Vermischen von Wasser mit einer entsprechenden Menge einer gesättigten Lösung von Phosphor in einem niederen Alkanol oder einem Ether;
- 10 iii) rasches Zugeben einer der Lösungen zu der anderen unter kräftigem Rühren zur Bildung eines kolloidalen Sols; und, gewünschtenfalls, iv) Entfernen der überschüssigen Menge von Phosphor und/oder dem niederen Alkanol oder Ether von dem Sol bei einer Temperatur im Bereich von 0 bis 10°C.

14. Aggregat nach Anspruch 13, wobei in Stufe i) das Salz, die Säure oder der Komplex Tetrachlorgold(III)-säure ist; in Stufe ii) das niedere Alkanol Ethanol ist; die Stufe iii) bei einer Temperatur von 0 bis 4°C durchgeführt wird; in Stufe iv) das Entfernen von Phosphor und/oder Ethanol unter reduziertem Druck nach Zugabe einer für die Umwandlung des restlichen Phosphors zu Phosphin ausreichenden Menge einer Base vorgenommen wird.

15. Testkit zum quantitativen oder qualitativen Bestimmen bindungsfähiger Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß er ein in einem der Ansprüche 1 bis 8 beanspruchtes Aggregat enthält.